

Biotechnologie des lipides : Quelques applications possibles

J. GRAILLE (1), M. PINA (1) et D. MONTET (1)

Résumé. — Le présent article fait une mise au point des travaux en cours ou récemment publiés en Biotechnologie des Lipides. Il indique quelques applications possibles pour résoudre des problèmes rencontrés dans le domaine de l'huilerie et du raffinage ainsi que dans celui de l'oléochimie.

INTRODUCTION

L'utilisation d'enzymes pour la synthèse organique est devenue aujourd'hui un champ pluridisciplinaire très vaste rassemblant de nombreux chercheurs ; il suscite un intérêt grandissant au fil des années de la part du monde industriel.

Il est à remarquer que dans la plupart des réactions décrites dans la littérature, les enzymes sont mises en œuvre pour des réactions très voisines de celles pour lesquelles la nature les a destinées *in vivo*.

Les progrès enregistrés aujourd'hui résultent d'une observation qui consiste en ce que les catalyseurs biologiques sont aptes à catalyser des réactions *in vitro* qui n'ont plus rien à voir avec les réactions pour lesquelles ils étaient programmés *in vivo* ; en particulier les conditions expérimentales s'en écartent très souvent radicalement.

Les enzymes sont utilisées en fait comme de simples catalyseurs de la chimie organique, à la différence fondamentale près que les catalyseurs biologiques sont très souvent spécifiques, régiosélectifs ou énantiosélectifs pour des réactions pour lesquelles ils n'étaient pas programmés *in vivo*.

Dans cet article le mot enzyme comprend les enzymes en l'état ou fixées sur un support artificiel ou naturel lorsqu'il s'agit des cellules entières qui peuvent être dévitalisées, ou vivantes en non-croissance ou en croissance.

Sans avoir la prétention d'être exhaustif cet exposé s'efforce de faire un tour d'horizon le plus large possible en donnant le maximum d'exemples.

I. — APPLICATIONS POSSIBLES EN HUILERIE ET EN RAFFINAGE

1. — Huilerie.

La Profession s'ingénie depuis toujours à trouver les meilleures conditions d'extraction des huiles aussi bien à partir des graines que des pulpes. Les procédés mécaniques seuls ne permettent pas une extraction totale et bien sou-

vent, surtout dans le cas des graines, on poursuit l'extraction par l'hexane.

Depuis quelques années on s'est inquiété de comprendre pourquoi on laisse systématiquement de l'huile dans les graines et les pulpes. On sait aujourd'hui que malgré le travail thermique et mécanique des tissus oléifères, toutes les cellules n'éclatent pas. Ces 2 traitements sont complémentaires ; le traitement thermique, comme la stérilisation dans le cas des fruits de palme, provoque la dislocation de la charpente lignocellulosique et pectique qui maintient la cohérence entre les cellules oléifères ; la pression permet ensuite de faire éclater les cellules libérées et l'huile est ainsi exprimée ; certains chercheurs ont alors pensé que, partant du principe selon lequel on pourrait faire une digestion enzymatique des parois cellulaires, l'assistance de l'extraction classique par une enzyme ou une association d'enzymes adaptées contribuerait à une amélioration sensible des taux d'extraction.

C'est ainsi que certains auteurs ont étudié les cellulases, les hémicellulases, les pectinases, les protéinases, les amylases, etc.

Nous citerons par exemple les travaux de Lanzani *et al.* [1] sur colza, tournesol et arachide, Fullbrook [2] sur le colza et le soja, de Cintra *et al.* [3] pour l'huile de coco, de Buenrostro et Lopez-Munguia [4] pour l'avocat, et enfin les nombreux travaux sur l'olive effectués par des équipes italiennes et espagnoles ; en particulier les travaux de Léone *et al.* [5] et de Martinez-Suarez [6] ont mis en œuvre une pectinase extraite d'*Aspergillus niger* commercialisée par Novo sous le nom de Pectinex. Que ce soit par le procédé décantation/centrifugation ou pression/centrifugation (Tabl. I, II) on constate une amélioration de l'extraction.

D'une manière générale, on peut estimer à 1,2 % le gain moyen sur la base huile, soit environ 2 kg d'huile en plus pour 1 000 kg d'olives. On constate également que l'huile est de meilleure qualité.

2. — Raffinage.

a) Démucilagination.

La biotechnologie pourrait également intervenir dans la démucilagination des huiles brutes. En effet, certaines huiles sont difficilement raffinables à cause de leur haute

(1) Division Chimie des corps gras, IRHO-CIRAD B P 5035, 34032 Montpellier Cedex (France)

TABLEAU I. — Extraction assistée de l'huile d'olive (*Assisted extraction of olive oil*)
[d'après (*according to*) Novo]

	Poids d'olives (<i>Weight of olives</i>) (kg)	Temps de broyage (<i>Crushing time</i>) (min)	Quantité d'enzyme pour 10 l d'eau (<i>Quantity of enzyme for 10 l of water</i>) (ml)	Temps de malaxage (<i>Mixing time</i>) (min)	0 °C	Quantité d'huile (<i>Quantity of oil</i>) (kg)	Rendement (<i>Yield</i>) (%)	% d'augmentation (% <i>Increase</i>)	
								Base olives (<i>Olive basis</i>)	Base huile (<i>Oil basis</i>)
Essais (<i>Trials</i>)									
I : Témoin (<i>Reference blank</i>)	430	15		37	25,0	58,60	13,63		
II : Pectinex ULTRA SP 200 g/tonne	440	15	88,0	37	24,1	61,60	14,00	0,37	2,73
III : Pectinex ULTRA SP 300 g/tonne	428	15	128,4	32	24,7	61,60	14,40	0,77	5,61

Variété (*Variety*) : olives vertes (*green olives*) (Manzanillas).

Procédé (*Process*) : décantation centrifugation, 3 jours après récolte (*3 days after harvest*).

TABLEAU II. — Extraction assistée de l'huile d'olive (*Assisted extraction of olive oil*)
[d'après (*according to*) Novo]

	Poids d'olives (<i>Weight of olives</i>) (kg)	Temps de broyage (<i>Crushing time</i>) (min)	Quantité d'enzyme pour 10 l d'eau (<i>Quantity of enzyme for 10 l of water</i>) (ml)	Temps total moulin presse (<i>Total time in press mill</i>) (min)	0 °C	Quantité d'huile (<i>Quantity of oil</i>) (kg)	Rendement (<i>Yield</i>) (%)	% d'augmentation (% <i>Increase</i>)	
								Base olives (<i>Olive basis</i>)	Base huile (<i>Oil basis</i>)
Essais (<i>Trials</i>)									
I : Témoin (<i>Reference blank</i>)	390	15		68	30,3	80	20,51		
II : Pectinex ULTRA SP 250 g/tonne	397	15	100	62	31,0	88	22,16	1,65	8,0

Variété (*Variety*) : type Syrie (*Syria type*).

Procédé (*Process*) : pression centrifugation, 1 semaine après récolte (*1 week after harvest*).

teneur en phospholipides ; les huiles raffinées obtenues sont alors moins résistantes aux attaques thermiques, oxydatives et thermooxydatives. Rappelons que la démucilagination consiste à traiter l'huile par une certaine quantité d'eau entre 40 et 60 °C suivant les cas. Les phospholipides hydratés s'hydratent et sont éliminés par centrifugation.

Une partie importante des phospholipides difficilement hydratés restent au sein de l'huile. Il est aisé d'imaginer d'introduire une phospholipase C industrielle dans la phase aqueuse.

Les phospholipides seraient alors transformés en diglycérides et les lysophosphatides en monoglycérides. La réaction libérerait des phosphates hydrosolubles. Le bilan de l'opération serait intéressant en ce sens que les pertes à la démucilagination seraient limitées car les glycérides partiels seraient retenus dans l'huile ; d'autre part l'élimination du phosphore sous forme de phosphates est plus aisée que sous forme de phospholipides qui sont des germes puissants d'émulsions.

La phospholipase de *Bacillus cereus* pourrait convenir mais il faudrait que cette enzyme soit meilleur marché pour ne pas augmenter les coûts d'une façon rédhibitoire.

b) Neutralisation.

La biotechnologie peut intervenir dans la réduction enzymatique de l'acidité des huiles hyperacides comme le sont un certain nombre d'huiles tropicales et en particulier l'huile de son de riz. Ces huiles tropicales acides sont difficilement raffinables à cause de l'acidité trop élevée pour deux raisons essentielles :

— l'une technologique : la forte teneur en savons après neutralisation provoque la formation d'émulsions irréductibles,

— l'autre économique : la perte importante au raffinage.

Une huile acide contient, par voie de conséquence, de fortes teneurs de glycérides partiels et d'acides gras libres. On pourrait concevoir le traitement de l'huile par une lipase en milieu peu hydraté, permettant de réestérifier les glycérides partiels par les acides gras libres.

En reconstituant ainsi les triglycérides, on pourrait abaisser considérablement l'acidité jusqu'à un niveau rendant possible le raffinage à la soude, 2 à 5 % d'acidité serait un niveau tout à fait acceptable comparé aux 15 à 30 % à l'origine.

c) Décoloration.

L'utilisation d'enzyme est également envisagée pour la décoloration des huiles ; quelques travaux ont été effectués dans ce domaine. Lors des dernières conférences sur le palmier à huile et l'huile de palme, Cheah Suan Choo et Ong en 1987 [7] ont envisagé cette possibilité en se basant sur le fait que l'on blanchit le pain avec de la farine de soja connue pour son activité lipoxgénase.

Cependant, il est connu que le phénomène d'oxydation est une réaction couplée faisant intervenir une molécule de carotène pour une molécule d'acide gras polyinsaturé.

Par analogie, les auteurs envisagent la décoloration de l'huile de palme brute à basse température, comme l'ont déjà effectuée Levadoux *et al.* [8], pour éliminer la chlorophylle de l'huile de canola. Ce domaine d'application demande beaucoup de recherches car l'on forme inévitablement des hydroperoxydes tant redoutés par la Profession.

II. — OLÉOCHIMIE

Un certain nombre d'opérations chimiques industrielles pourraient être améliorées en leur substituant des procédés biologiques. C'est, par exemple, le cas de l'obtention des acides gras par hydrolyse ; la scission lipolytique est réputée donner des acides gras d'une meilleure qualité sur le plan de la couleur et de la pureté. L'interstérification, opération unitaire de l'industrie des corps gras dont l'objectif est essentiellement de modifier les propriétés rhéologiques des corps gras, pourrait être améliorée par la mise en œuvre de lipase comme catalyseur en ce sens que l'on peut obtenir des composés ayant en plus des propriétés nutritionnelles supérieures du fait d'une répartition glycéridique des acides gras plus satisfaisante. La biologie peut également intervenir utilement pour des réactions industrielles telles que l'estérification, la production d'amides N substitués ou la modification des chaînes car, dans bien des cas, on peut obtenir des produits chimiques mieux définis donc plus précis pour certains usages industriels.

Le domaine le plus avancé est évidemment celui des lipases, puisque les triglycérides sont les substrats naturels de ces enzymes. Nous développerons peu les réactions d'hydrolyse ou de simple réestérification du glycérol car une littérature abondante, connue de tous, est maintenant largement disponible.

1. — Hydrolyse.

Il est admis de dire que l'hydrolyse totale des corps gras par les lipases en réacteurs continus donne des acides gras d'une qualité supérieure aux acides gras traditionnels ; en fait on oublie de dire que pour avoir un taux d'hydrolyse maximal, on doit travailler avec des corps gras nobles de bonne qualité sinon les lipases sont inopérantes.

L'hydrolyse devient précieuse lorsqu'elle est sélective soit régiosélective 1-3, soit typosélective (sélective d'un seul acide gras). Il est possible d'hydrolyser sélectivement l'acide pétrosélinique de l'huile de persil avec une lipase extraite d'une levure du genre *Candida* [Comeau, 9].

D'autre part, on peut préparer des β monoglycérides purs à l'aide de lipase régiosélective 1-3 ; lorsque l'on sait que la position β est souvent très riche en acides gras polyinsaturés dans le règne végétal, on peut prétendre préparer par cette voie, des β monoglycérides quelquefois constitués uniquement d'un seul acide gras, en choisissant convenablement l'huile de départ [El Zant, 10].

2. — Interstérification.

On parlera uniquement d'interstérification en absence de solvant c'est-à-dire en milieu fondu.

L'interstérification chimique conduit à une distribution statistique des acides gras sur les 3 positions du glycérol. C'est une réaction rapide, en général complète au bout de 20 min à 90 °C. La réaction doit être effectuée sur un substrat presque entièrement raffiné et en milieu anhydre faute de quoi le catalyseur, généralement le méthylate de sodium, est inactivé.

L'interstérification régiosélective 1-3 (IR 1-3) biocatalysée par une lipase 1-3 spécifique n'affecte que les positions 1 et 3 des triglycérides et, de ce fait, limite la distribution au hasard à ces deux positions, conduisant ainsi à un nombre de triglycérides plus restreint. Les avantages technologiques de l'IR 1-3 sont multiples :

- la composition des acides gras en position β reste inchangée, or cette position est particulièrement riche en acides gras insaturés essentiels ; il est donc intéressant sur le plan nutritionnel de les conserver sur cette position car les β monoglycérides issus de la digestion pancréatique sont les transporteurs principaux des acides gras essentiels à travers la paroi intestinale. On remarquera que dans le cas de l'interstérification stochastique, une partie importante des acides gras en position β est échangée avec une partie des acides gras des positions externes ;

- la formation de triglycérides à haut point de fusion généralement observée dans les réactions d'interstérification chimique est évitée ou considérablement limitée ;

- les réactions enzymatiques étant plus lentes, on peut mieux contrôler la réaction sur le plan cinétique principalement lorsqu'on souhaite une réaction incomplète. La qualité rhéologique du produit sera donc très reproductible ;

- alors que l'interstérification classique exige de travailler sur des substrats partiellement raffinés et anhydres, cette obligation n'est plus nécessaire dans le cas de l'IR 1-3 ;

- l'IR 1-3 nécessite des températures relativement basses, comprises entre 35 et 60 °C ; on devrait donc observer un gain de qualité ;

- le fait de pouvoir travailler sur des substrats bruts, ou succinctement raffinés à une température relativement basse, permet de réaliser une économie d'énergie substantielle.

Le tableau III donne une image des effets des trois types d'interstérification sur le stéaryl 1, linoléyl 2, oléyl 3 glycérol : stochastique, dirigée et régiosélective 1-3.

Dans le cadre de travaux récents sur les huiles végétales tropicales, Muderhwa [11], a étudié l'interstérification régiosélective 1-3 inter-huiles en utilisant comme huile de base, l'huile de palme ou ses fractions et comme contre-huiles, les huiles suivantes : palmiste, coco, soja, colza et son de riz.

Il a remarqué que la mise en œuvre d'une lipase sous forme libre ou fixée, en l'état ou modifiée, nécessite un procédé fiable de détermination de l'aptitude à l'interstérification qui, *a priori*, aurait pu être déterminée par la mesure de l'activité hydrolytique par l'une des nombreuses méthodes décrites dans la littérature.

Tout d'abord, il a utilisé la méthode de la Fuji-Oil [12], puis la méthode de Novo décrite par Hensen et Eigtved [13].

Fuji-Oil met en œuvre 10 g d'huile de coco et 10 g de stéarate de méthyle, soit grossièrement un rapport molaire

TABLEAU III. — Action des trois types d'interestérification sur le stéaryl 1, linolényl 2, oléyl 3 glycérol
(Action of 3 types of interesterification on stearyl 1, linolenyl 2, oleyl 3 glycerol)

Triglycérides	Résultats en % (Results in %)			
	Stochastique (Random)		Dirigée (Directed)	Régiosélective 1-3
S ₃	3,70		33,33	—
O ₃	3,70		8,33	—
L ₃	3,70		8,33	—
S ₂ O	11,10	SSO + SOS	—	—
S ₂ L	11,10	SSL + SLS	—	—
O ₂ S	11,10	OOS + OSO	—	—
O ₂ L	11,10	OOL + OLO	25,00	OLO 25,00
L ₂ S	11,10	LLS + LSL	—	SLS 25,00
L ₂ O	11,10	LLO + LOL	25,00	—
SLO	22,20	SLO + SOL	—	SLO 50,00
		+ LOS		

de 1 à 2,3, et 1 g de biocatalyseur. La réaction s'effectue à 40 °C pendant 24 h.

Novo met en œuvre 12 ml d'une solution équimoléculaire (56 mM) de trioléine et d'acide palmitique dans l'éther de pétrole, ainsi que 275 mg de lipozyme. La réaction est conduite à 40 °C pendant 15 à 30 minutes.

Dans les deux cas on sépare les triglycérides des esters méthyliques (Fuji-Oil) ou des acides gras libres (Novo) par chromatographie sur couche mince ou sur colonne.

Fuji analyse l'incorporation de l'acide laurique dans le stéarate de méthyle et Novo l'incorporation de l'acide palmitique dans le trioléine.

Les mesures sont faites par CPG ou HPLC. Dans les deux cas les auteurs considèrent la réaction comme du 1^{er} ordre.

Si « a » est la concentration en C 12 en position externe et « b » la concentration en C 12 dans le stéarate de méthyle, le taux de conversion est $x = b/a$; la constante de vitesse s'exprime par :

$$k = 1/t \ln 1/1 - x,$$

avec $t = 1$ jour on en déduit une activité spécifique de transestérification (AST) :

$$K_a = k \frac{\text{Quantité de substrat mis en jeu} = 20 \text{ g}}{\text{Quantité de biocatalyseur mis en jeu} = 1 \text{ g}}$$

$$\text{ce qui donne : } K_a = 20 \ln \frac{1}{1 - x}.$$

Fuji détermine ensuite l'activité lipolytique spécifique A en micromoles d'acides gras libérés par minute et par gramme de biocatalyseur suivant la méthode de Fukumoto [14] puis il considère le rapport $K_r = K_a/A$ comme caractéristique du biocatalyseur. Dans un premier temps, Muderhwa a utilisé la méthode de Fuji mais il s'est rapidement rendu compte que K_r n'a aucune signification aussi bien pratique que théorique car il n'y a aucune relation entre les 2 types de réactions (interestérification et hydrolyse).

Ainsi, il a constaté qu'une préparation catalytique ayant une forte activité lipolytique peut présenter indifféremment une faible, voire nulle, ou une forte activité d'interestérification ; il en est de même pour une préparation catalytique ayant une faible activité lipolytique.

Muderhwa s'est alors limité à la détermination de l'activité d'interestérification suivant Novo, mais il a conservé les substrats de Fuji (huile de coprah et stéarate de méthyle) et travaillé en milieu fondu (sans solvant).

Dans ces conditions il a exprimé l'activité d'interestérification ou de transestérification en micromoles d'acide laurique incorporé par minute dans le stéarate de méthyle.

Bien que significatif, le test selon Novo ne permet pas de calculer l'activité spécifique des catalyseurs, car dans les conditions expérimentales choisies, il trouve que l'activité spécifique de transestérification croît en fonction de la quantité de biocatalyseur (Tabl. IV), ce qui est évidemment absurde puisque celle-ci doit être constante par définition.

Il a alors recherché ce qui différencie la réaction d'hydrolyse de la réaction d'interestérification lorsqu'il détermine les activités spécifiques. Dans le cas de l'hydrolyse, les deux substrats sont l'ester et l'eau et dans le cas de la transestérification, ce sont le stéarate de méthyle et les triglycérides de coprah.

Dans le cas de l'hydrolyse l'eau est en large excès, alors que dans le cas de la transestérification les quantités de triglycérides et de stéarate de méthyle sont du même ordre de grandeur ; or, dans ces conditions, il est incorrect de faire des mesures en considérant la réaction comme du premier ordre. En effet, lorsqu'on fait une détermination de l'ordre de réaction ou de la constante de vitesse, on doit se placer dans des conditions telles que seule la concentration du réactant (ou du produit) sur lequel on fait la mesure, soit variable.

Pour respecter ce principe et se trouver dans des conditions analogues à l'hydrolyse, Muderhwa a mis en œuvre une quantité importante d'huile de coprah par rapport au stéarate de méthyle ; il a alors trouvé des résultats tout à fait convenables pour le rapport molaire 20/1. Le tableau V illustre ces résultats et montre que dans le cas du lipozyme, l'AST a une valeur moyenne de 20 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

TABLEAU IV. — Mesure de l'activité spécifique de transestérification (A.S.T.) en fonction de la quantité de biocatalyseur pour un rapport molaire Huile de coprah/Stéarate de méthyle = 1
(Measurement of specific transesterification activity — STA — depending on the quantity of biocatalyst for a copra oil/methyl stearate molar ratio of 1)

Lipozyme de (of) Novo (% poids - weight)	2	4	6	10
A.S.T. (S.T.A.) ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	5,7	11,5	17,0	28,0

TABLEAU V. — Mesure de l'activité spécifique de transestérification (A.S.T.) en fonction de la quantité de biocatalyseur pour un rapport molaire Huile de coprah/Stéarate de méthyle = 20
(Measurement of specific transesterification activity — STA — depending on the quantity of biocatalyst for a copra oil/methyl stearate molar ratio of 20)

Lipozyme de (of) Novo (% poids - weight)	2	4	6
A.S.T. (S.T.A.) ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	20,5	19,5	20,5

Grâce à ce principe de base, il a été possible de comparer rationnellement 3 lipases issues de trois microorganismes différents (*Candida deformans*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei*), mises en œuvre sous différentes formes : en l'état, fixées sur célite, cellules dévitalisées.

Il a obtenu les résultats consignés dans les tableaux VI, VII et VIII qui permettent de tirer les conclusions suivantes :

Pour un microorganisme donné, on constate que l'activité de la lipase augmente dans le sens suivant :

Lipase < Lipase fixée (Célite) < Cellule.

La fixation d'une lipase sur une résine échangeuse d'ions macroporeuse augmente considérablement l'activité de la lipase. On constate que l'activité du lipozyme est 40 fois plus élevée que celle de la lipase libre. Ce facteur serait encore plus important si on avait rapporté l'activité à la quantité d'enzyme fixée sur la résine.

L'utilisation de cellules entières semble être une solution prometteuse, en ce sens que l'on dispose en fait d'une lipase fixée naturellement et que l'on peut aisément confiner des cellules, soit simplement en mélange avec un support minéral comme la silice, soit dans un réticulum convenable. Sur le plan économique, un réacteur à lit fixe à cellules confinées serait certainement bien meilleur marché qu'un réacteur à lit fixe composé d'une lipase fixée.

Ainsi, il a estimé le coût de 1 kg de catalyseur à base de cellules de *Rhizopus arrhizus* ; il se situe entre 30 et 40 F/kg soit 100 fois moins cher que le lipozyme de Novo.

Il faut cependant remarquer que le lipozyme fait en 4 heures ce que fait *Rhizopus arrhizus* en 24 heures, mais il faudra tenir compte aussi de la durée de vie du catalyseur.

A l'heure actuelle, aucun exemple industriel n'a été publié ; sur le plan du laboratoire on pense que l'avenir sera peut-être du côté de l'utilisation des cellules.

TABLEAU VI. — Aptitude à la transestérification de la lipase de *Candida deformans* sous différentes formes
(Transesterification ability of the *Candida deformans* lipase in different forms)

<i>Candida deformans</i>	Lipase			Cellules (<i>Cells</i>)	
Biocatalyseur (<i>Biocatalyst</i>)	en l'état (<i>original state</i>)	supportée (célite) (<i>on support-celite</i>)		1 ^{er} essai (<i>1st trial</i>)	Recyclages (<i>Recycling</i>)
					12
% poids (<i>weight</i>)	10	10	35,5	30	3030
A.S.T. (<i>S.T.A.</i>) ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	1,3	1,2	3,9	6,6	6,26,0
Durée (jours) (<i>Duration-days</i>)	8	8	8	5	55
% Conversion	10,4	29,7	96,3	99,3	99,198,7

TABLEAU VII. — Aptitude à la transestérification de la lipase de *Rhizopus arrhizus* sous différentes formes
(Transesterification ability of the *Rhizopus arrhizus* lipase in the different forms)

<i>Rhizopus arrhizus</i>	Lipase		Cellules (Cells)	
Biocatalyseur (Biocatalyst)	en l'état (original state)	supportée (célite) (on support-celite)	1 ^{er} essai (1st trial)	
% poids (weight)	10	10	35,5	20
A.S.T. (S.T.A.) ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	4,6	4,5	9,3	27,3
Durée (jours) (Duration-days)	6	6	7	1 h
% Conversion	80,4	32,4	99,5	96,0

TABLEAU VIII. — Aptitude à la transestérification de la lipase de *Mucor miehei* sous différentes formes
(Transesterification ability of the *Mucor miehei* lipase in different forms)

<i>Mucor miehei</i>	Novo		CBS 370-65	
Biocatalyseur (Biocatalyst)	Lipozyme	en l'état (original state)	en l'état (original state)	Cellules (Cells)
% poids (weight)	6	10	10	20
A.S.T. (S.T.A.) ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	20,5	5	0,03	0,25
Durée (Duration)	4 h	3 j (d)	2 j (d)	2 j (d)
% Conversion	99,8	99,8	0,3	4,0

3. — Estérification.

L'estérification est intéressante lorsque les molécules obtenues sont définies et dans un état de haute pureté.

Par exemple, il est possible de préparer en milieu biphasique des α -monoglycérides ou des diglycérides 1-3 en mettant en œuvre une lipase 1-3 spécifique et du glycérol dans la phase aqueuse et les acides gras dans la phase organique [Gattefosse, 15].

Si la phase organique est un solvant chloré (chloroforme ou dichlorométhane), on synthétise exclusivement des α -monoglycérides. Lorsque cette phase est constituée d'hydrocarbures comme l'hexane, l'heptane, le cyclohexane, etc. on obtient exclusivement des diglycérides 1-3.

On explique facilement la sélectivité par le fait que la réaction a lieu à l'interface, et que les premiers produits synthétisés sont les α -monoglycérides ; en effet ces derniers, très solubles dans les solvants chlorés, quittent rapidement l'interface, alors que dans le cas des hydrocarbures, dans lesquels ils sont quasiment insolubles, ils séjournent à l'interface où ils subissent une deuxième acylation conduisant aux diglycérides 1-3 alors très solubles dans les hydrocarbures, ce qui leur permet alors de quitter rapidement l'interface.

L'estérification des monoalcools en milieu fondu par des acides gras conduit à des cires avec des rendements quasiment quantitatifs [Hensen et Eigtved, 13]. Nous ne nous étendrons pas sur ce type de réaction largement décrit dans la littérature.

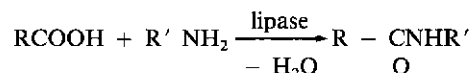
Il est à noter que les thiols sont facilement estérifiés par les acides gras et que réciproquement les thioesters sont facilement hydrolysés [Gattefosse, 15 ; Renard *et al.*, 16].

L'estérification des sucres par les acides gras, catalysée par les lipases, est un sujet qui mobilise de nombreuses équipes de recherche dans le monde entier. Certains laboratoires y sont parvenus mais les rendements ou les coûts de production ne sont pas satisfaisants [Klibanov, 17].

4. — Amides N substitués.

Les lipases sont en fait des acyl transférases aptes à fonctionner sur des hétéroatomes autres que l'oxygène.

Elles fonctionnent avec le soufre mais également avec l'azote et le phosphore. Ainsi, il est parfaitement possible de préparer des amides à partir d'un acide gras et d'une amine grasse :



La réaction est lente mais on obtient 80 % de rendement en moins de 400 heures (Fig. 1). L'eau joue un rôle très important et l'on a constaté qu'au-delà d'une activité (a_w) de 0,5 le taux de synthèse chute considérablement [Montet *et al.*, 18] (Fig. 2). Les conditions optimales sont les suivantes : 500 mg d'acide oléique, 330 mg de laurylamine (rapport molaire 1/1 ; 1,775 mmole/1,775 mmole), 15 ml d'hexane, 60 °C sous vibro-agitation en présence de 100 mg de lipozyme de Novo.

Montet *et al.* [18] ont également étudié l'acylation à basse température des amino-propanols (amino 1 propanol 2, amino 2 propanol 1 et amino 1 propanol 3). L'hexane s'est avéré être le meilleur solvant conduisant au taux de conversion le plus élevé (85 %). Dans tous les cas tous les produits possibles sont synthétisés dans des proportions très diverses. On obtient ainsi :

- l'aminopropanol N acylé,
- l'aminopropanol O acylé,
- l'aminopropanol O, N diacylé.

On constate qu'un excès d'acides gras favorise la diacylation. Pour un rapport molaire 1/1 et lorsque les 2 fonctions sont vicinales l'enzyme favorise toujours l'acylation de la fonction amine et sur un plan cinétique dans le cas de l'amino 1 propanol 3, l'acylation de la fonction amine est plus rapide que celle de la fonction alcool.

D'autre part lorsque les 2 fonctions sont vicinales, la fonction amine réagit plus vite en position 1 qu'en position 2.

Il a été montré que si l'on veut obtenir un produit N acylé pur contenant une fonction alcool libre on devra mettre en œuvre 1 mole d'amino 1 propanol 2 pour une mole d'acide gras.

5. — Modification des chaînes aliphatiques.

La transformation des acides gras par désaturation, hydrogénation, hydroxylation, oxydation, amination, etc., fait toujours partie des rêves des bio-organiciens. En effet, à ce jour, ces réactions sont possibles uniquement dans les systèmes vivants. Les quelques réactions reproduites *in vitro*, semblent difficiles à transposer en réacteur à cause du fait que les enzymes impliquées nécessitent des co-facteurs comme le NADH ou le NADPH difficiles à régé-

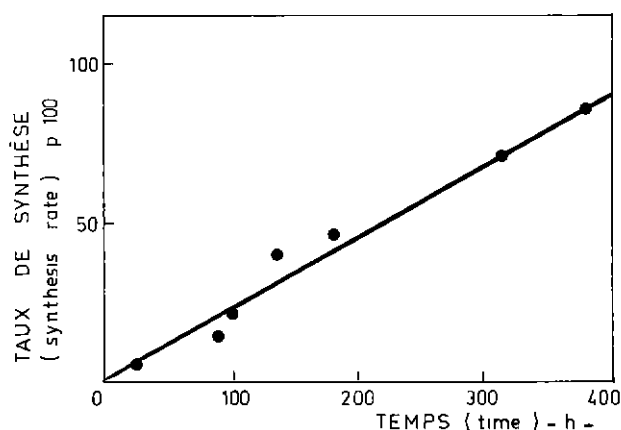


FIG. 1. — Influence du temps de réaction sur le taux de synthèse d'amides N substitués (Effect of reaction time on substituted N amide synthesis rate).

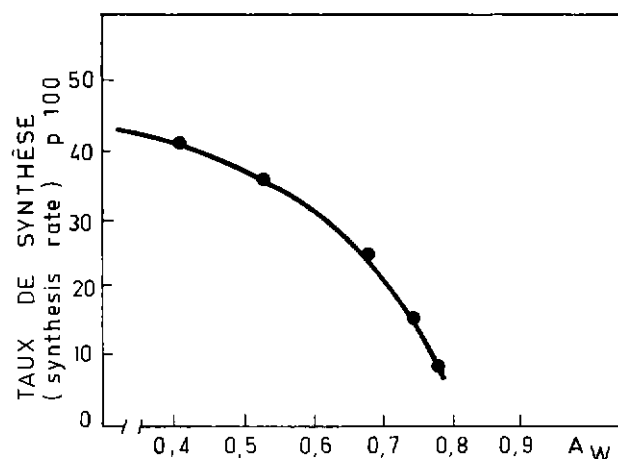


FIG. 2. — Influence de l'activité de l'eau (A_w) sur le taux de synthèse d'amides N substitués (Effect of water activity- A_w -on substituted N amide synthesis rate).

nérer quantitativement ; citons cependant les travaux de Fukui et Tanaka [19] et de Van Berkel-Arts *et al.* [20]. Citons également les travaux de Cardillo, Fedeli et d'Angiuro [21] concernant l'oxydation en réacteur continu de l'acide linoléique par la lipoxigénase de soja purifiée et greffée sur des supports inertes. Les résultats semblent encourageants dans ce cas, car apparemment cette enzyme ne nécessite pas de co-facteurs.

CONCLUSION

Globalement on constate que l'activité du champ pluridisciplinaire que constitue la **biotechnologie des corps gras** est encore trop réduite dans le monde mais, ce qui est

important, c'est que la Profession a pris conscience des potentialités immenses de cette science et le récent Congrès de Hambourg en 1987 [22] en est le meilleur témoin.

Sur le plan pratique, on retiendra qu'à l'heure actuelle de gros efforts doivent être entrepris dans l'élaboration et la stabilisation des biocatalyseurs et que pour l'instant seules les réactions donnant accès à des molécules à haute valeur ajoutée peuvent avoir un avenir immédiat.

Pour clore cet exposé, il est nécessaire et important de noter que pour réussir en biotechnologie des corps gras, il est recommandé de constituer une équipe pluridisciplinaire de chimistes organiciens, de biochimistes, de microbiologistes, de spécialistes de génie chimique et d'analyse chimique, ce qui est hélas rarement le cas.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LANZANI A., PETRINI M. C., COZZOLI O., GALLAVRESI P., CAROLA C. et JACINI G. (1975). — On the use of enzymes for vegetable-oil extraction. A : preliminary note. *Riv. Ital. Sost. gr.*, **52**, p. 226-229.
- [2] FULLBROOK P. D. (1983). — Use of enzymes in the processing of oilseeds. *J. am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 428A-430A.
- [3] CINTRA Mc GLONE O., LOPEZ-MUNGUIA-CANALES A. & VERNON-CARTER J. (1986). — Coconut Oil extraction by a new enzymatic process. *J. Food Science*, **51**, p. 695-697.
- [4] BUENROSTO M. & LOPEZ-MUNGUIA C. A. (1986). — Enzymatic extraction of avocado oil. *Biotechnol. Letters*, **8**, p. 505-506.
- [5] LEONE A. M., ALMPARELLI F., LA NOTTE E., LLIUZZI V. A. & PADULA M. (1977). — The use of a pecto-cellulolytic system in olive oil making. Product yield and quality. *Riv. Ital. Sost. gr.*, **54**, p. 514-530.
- [6] MARTINEZ-SUAREZ J. M., MUNOZ-ARANDA E., ALBAMENDOSA J. et LANZON REY A. (1977). — Rapport de l'huile expérimentale de l'Institut de la Grasse de la campagne 1975-76 *Grassas y Aceites*, **28**, p. 31-36.
- [7] CHEAH SUAN CHOO & ONG A. S. H. (1987). — Application of enzyme reactions to oils and fats with special reference to palm oil (T 10). 1987 International oil palm/palm oil conferences — progress and prospects (Kuala Lumpur-Malaysia). Conference II Technology (29/6-1/7/1987).
- [8] LEVADOUX W. L., KALMOKOFF M. L., PICKARD M. D. & GROOTWASSINK J. W. D. (1987). — Pigment removal from canola oil using chlorophyllase. *J. am. Oil Chem. Soc.*, **64**, p. 139-144.
- [9] COMEAU L. (1987). — (Observations non publiées) Renseignements disponibles à : Laboratoire de Chimie biologique appliquée. Université d'Aix-Marseille III, 3, place Victor-Hugo, 13331 Marseille Cedex 3.
- [10] EL ZANT A. (1987). — Synthèse enzymatique d'esters gras et de leurs homologues. Thèse soutenue le 15 octobre 1987 à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- [11] MUDERHWA J. (1987). — Biofaçonnement des huiles végétales par interstérification inter-huiles catalysée par les lipases régiosélectives 1-3 : Valorisation de l'huile de palme et de sa partie concrète Thèse soutenue le 30 octobre 1987 à l'Université des sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- [12] FUJI OIL (1981). — Method for enzymatic transesterification of lipid and enzyme used therein. *Brevet européen*, N° EPO 035 883 A2.
- [13] HENSEN T. T. & EIGTVED P. (1985). — A new immobilized lipase for interesterification and ester synthesis. World conference on emerging technologies in the Fats and Oils Industry *Congrès AOCS/AFECG Cannes 3-8/11/1985*. Actes édités par A. R. Baldwin, p. 365-369.
- [14] FUKUMOTO J., Iwai M. & TSUJISAKA Y. (1963). — Studies on lipase. I. — Purification and crystallization of a lipase secreted by *Aspergillus niger*. *J. General and applied Microbiology*, **9**, p. 353-360.
- [15] GATTEFOSSE (1985). — Procédé de synthèse d'esters d'acides organiques et d'alcools en phase hétérogène par catalyse enzymatique. *Brevet Français*, N° 85 14827.
- [16] RENARD G., GRIMAUD J., EL ZANT A., PINA M. & GRAILLE J. (1987). — An improved method for the colorimetric assay of lipase activity using an optically clear medium. *Lipids*, **22**, p. 539-541.
- [17] KLIBANOV A. M. (1987). — Enzymatic conversions in organic solvents. *Pharmaceutical technology*, p. 34-35.
- [18] MONTET D. (1987). — (Observations non publiées.) Renseignements disponibles à : IRHO/CIRAD, Division Chimie des Corps Gras, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex.
- [19] FUKUI S. & TANAKA A. (1982). — Immobilized Microbial Cells. *Ann. Rev. Microbiol.*, **36**, p. 145-172.
- [20] VAN BERKEL-ARTS A., DEKKER M., VAN DIJK C., GRANDE H. J., HAGEN W. R., HILHORST R., KRUSEWOLTERS M., LAANE C. & VEEGER C. (1986). — Application of hydrogenase in biotechnological conversion. *Biochimie*, **68**, p. 201-209.
- [21] CARDILLO M., FEDELI F. & d'ANGIURO L. (1983). — Esperienze di ossidazione enzimatica continua. Congresso Scientifico sullo Studio delle Sostanze Grasse, Venezia 7-10 marzo 1983. Document disponible à : SSOG, Via Giuseppe-Colombo 79, 20133 Milano.
- [22] HAMBURG (1987). — World conference and exposition on Biotechnology for the Fats and Oils Industry Hamburg 27/9-2/10/1987 Organisé par l'AOCS et la DGF.

SUMMARY

Biotechnology of lipids : some possible applications.

J. GRAILLE, M. PINA and D. MONTET, *Oléagineux*, 1988, **43**, N° 4, p. 181-190.

This article takes stock of work currently under way or recently published on the biotechnology of lipids. It indicates some possible applications for solving the problems encountered in oil extraction, refining and oleochemistry.

RESUMEN

Biotecnología de los lípidos : algunas aplicaciones posibles.

J. GRAILLE, M. PINA y D. MONTET, *Oléagineux*, 1988, **43**, N° 4, p. 181-190.

En el presente artículo se puntualizan los trabajos pendientes o que acaban de publicarse en biotecnología de los lípidos, indicando algunas aplicaciones posibles para resolver los problemas encontrados en el ámbito de la planta procesadora y de la refinación, como también en la química de aceites.

Biotechnology of lipids : Some possible applications

J. GRAILLE (1), M. PINA (1) and D. MONTET (1)

INTRODUCTION

Today, the use of enzymes for organic synthesis has become an extremely vast multi-disciplinary field involving numerous researchers ; over the years, it has stirred up increasing interest in the industrial world.

It should be noted that in most of the reactions described in the literature, enzymes are used for reactions very similar to those which nature intended them for *in vivo*.

The progress achieved to date results from an observation that biological catalysts are capable of catalyzing reactions *in vitro* which no longer have anything to do with the reactions for which they were programmed *in vivo* ; in particular, experimental conditions are very often far removed from the *in vivo* situation.

In effect, the enzymes are used as simple organic chemistry catalysts, with the one fundamental difference that biological catalysts are very often specific, regioselective or enantioselective in reactions for which they were not programmed *in vivo*.

In this article, the word « enzyme » includes enzymes in their natural state or fixed on an artificial or natural support, when involving complete cells which may be devitalized, or living and may or may not be growing.

Without claiming to be exhaustive, this article endeavours to provide as comprehensive as possible an overview by giving a maximum number of examples.

I. — POSSIBLE APPLICATIONS IN OIL EXTRACTION AND REFINING

1. — Oil extraction.

The profession has always applied itself to finding the best conditions for oil extraction, either from seeds or from pulp. Mechanical processes alone do not ensure total extraction and quite often, especially with seeds, hexane extraction is carried out.

Over the last few years, attempts have been made to explain why oil is systematically left in the seeds or pulp. It is known today that despite the thermal and mechanical processing of oil-bearing tissue, not all the cells burst. These two processes are complementary ; thermal treatment, such as sterilization in the case of oil palm fruits, causes dislocation of the lignocellulosic and pectic structure, which maintains the coherence between the oil-bearing cells ; pressure then makes it possible to rupture the freed cells and the oil is then expressed. Based on the principle that enzymatic digestion of the cell walls would be possible, certain researchers then thought that the standard extraction process, assisted by an enzyme or combination of adapted enzymes, would contribute to the significant improvement of extraction rates.

It is in this way that certain authors have studied cellulases, hemicellulases, pectinases, proteinases, amylases, etc.

Worthy of mention is the work by Lanzani *et al.* [1] on rapeseed, sunflower and groundnut ; Fullbrook [2] on rapeseed and soybean ; Cintra *et al.* [3] on coconut oil ; Buenrosto and Lopez-Munguia [4] on the avocado and, finally, a considerable amount of work on the olive by Italian and Spanish teams ; in particular, the work by Leone *et al.* [5] and Martinez-Suarez [6], who used pectinase extracted from *Aspergillus niger* marketed by Novo under the name Pectinex. Whether by the decantation/centrifugation or pressure/centrifugation method (Tables I, II), an improvement in extraction is seen.

Generally speaking, the mean gain on an oil basis can be estimated at 1.2 %, i.e. approximately 2 kg of additional oil for 1,000 kg of olives. The oil is also seen to be of better quality.

2. — Refining.

a) Degumming.

Biotechnology could also play a role in the degumming of crude oils. In fact, certain oils are difficult to refine because of their high phospholipid content ; the refined oils obtained are then less resistant to thermal, oxidative and thermo-oxidative attack. Remember that degumming consists in treating the oil with a certain quantity of water between 40 and 60 °C depending on the case. The hydratable phospholipids are hydrated and are eliminated by centrifugation.

An important proportion of the phospholipids that are difficult to hydrate remain within the oil. It is simple to imagine the introduction of an industrial phospholipase C in the aqueous phase.

The phospholipids would then be converted into diglycerides and the lysophosphatides into monoglycerides. The reaction would release water-soluble phosphates. The result of the operation would be interesting in that the losses during degumming would be limited, because the partial glycerides would be retained in the oil ; in addition, the elimination of phosphorus is easier in phosphate form than in the form of phospholipids, which are powerful emulsion agents.

The *Bacillus cereus* phospholipase C could be appropriate, but this enzyme would need to be cheaper so as not to increase costs prohibitively.

b) Neutralization.

Biotechnology can also play a role in the enzymatic reduction of acidity in hyperacid oils, such as a certain number of tropical oils, especially rice bran oil. These acidic tropical oils are difficult to refine due to their excessive acidity, for two reasons :

- technological : the high soap content after neutralization causes irreducible emulsions,
- economic : the considerable losses during refining.

An acidic oil consequently has a high partial glyceride and free fatty acid content. Treatment of the oil by a lipase in a little-hydrated medium could be considered, making it possible to re-esterify the partial glycerides by the free fatty acids.

By reconstituting the triglycerides in this way, it would be possible to considerably reduce acidity to a level enabling soda refining. 2 to 5 % acidity would be a perfectly acceptable level compared to the original 15 to 30 %.

c) Bleaching.

The use of enzymes is also envisaged for bleaching oils ; a certain amount of work has already been carried out in this field.

During the last oil palm and palm oil conferences in 1987, Cheah Suan Choo and Ong [7] envisaged this possibility, based on the fact that bread is bleached with soybean meal, which is known for its lipoxygenase activity.

However, it is known that the oxidation phenomenon is a coupled reaction bringing into play a carotene molecule and a polyunsaturated fatty acid molecule.

By analogy, the authors envisage bleaching crude palm oil at low temperature, as already done by Levadoux *et al.* [8], to eliminate chlorophyll in canola oil. This field of application requires a great deal of research since hydroperoxides, which are so feared by the Profession, are inevitably formed.

II. — OLEOCHEMISTRY

A certain number of industrial chemical operations could be improved by replacing them with biological processes. This is the case, for example, for obtaining fatty acids by hydrolysis ;

(1) IRHO-CIRAD Oils and Fats Division, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France)

lipolytic splitting is reputed to give better quality fatty acids from a colour and purity point of view.

Interesterification, a unit operation in the oils and fats industry, which is basically designed to modify the rheological properties of fats and oils, could be improved by using lipase as a catalyst in that it is possible to obtain compounds which also have greater nutritional properties due to a more satisfactory glyceridic distribution of the fatty acids. Biology can also be usefully brought into play in industrial reactions such as esterification, the production of substituted N amides or chain modification, because in many cases it is possible to obtain chemicals which are better defined and therefore more precise for certain industrial uses.

The most advanced field is obviously that of lipases, since triglycerides are the natural substrates of these enzymes. We shall not enlarge upon hydrolysis reactions or simple glycerol re-esterification, because a considerable amount of well known literature is now widely available on these subjects.

1. — Hydrolysis.

It is acceptable to say that the total hydrolysis of fats and oils by lipases in continuous reactors gives higher quality fatty acids than those obtained from traditional methods; in fact, it goes unmentioned that, to have maximum hydrolysis, good quality noble fats and oils have to be used, otherwise the lipases are inoperative.

Hydrolysis becomes valuable when it is selective, either 1-3 regioselective, or type-selective (selective for a single fatty acid). It is possible to hydrolyse the petroselinic acid in parsley seed oil selectively, using a lipase extracted from a yeast such as the genus *Candida* [Comeau, 9].

In addition, it is possible to prepare pure β monoglycerides using 1-3 position-selective lipase. Given that the β position is often very rich in polyunsaturated fatty acids in the Plant Kingdom, it can be expected that this channel can be used to prepare β monoglycerides which are sometimes composed exclusively of a single fatty acid, by appropriately choosing the original oil [El Zant, 10].

2. — Interesterification.

Only interesterification without a solvent will be discussed here, i.e. in a melted medium.

Chemical interesterification leads to a statistical distribution of fatty acids on the 3 positions of the glycerol. It is a rapid reaction and usually takes 20 minutes at 90 °C. The reaction has to be conducted on an almost totally refined substrate in an anhydrous medium, otherwise the catalyst, which is usually sodium methylate, is inactivated.

1-3 regioselective interesterification (1-3 RI), biocatalyzed by a 1-3 specific lipase only affects the 1 and 3 positions of the triglycerides and therefore limits random distribution to these two positions, thereby leading to a more restricted number of triglycerides. The technological advantages offered by 1-3 RI are numerous:

- the composition of fatty acids in β position remains unchanged; this position is particularly rich in essential unsaturated fatty acids; it is therefore valuable, from a nutritional point of view, to keep them in this position, since the β monoglycerides arising from pancreatic digestion are the main carriers of essential fatty acids through the wall of the intestine. It will be noted that in the case of random interesterification, a considerable proportion of the fatty acids in β position is exchanged with part of the fatty acids in outer positions;

- the formation of triglycerides with a high melting point, which is generally seen in chemical interesterification reactions, is avoided or considerably limited;

- as enzymatic reactions are slower, the reaction can be better controlled from a kinetics point of view, mainly when an incomplete reaction is desired. The rheological quality of the product will therefore be very reproducible;

- whereas traditional interesterification makes it necessary to work on partially refined and anhydrous substrates, this obligation no longer exists in the case of 1-3 RI;

- the fact of being able to work on unrefined, or minimally refined substrates at a relatively low temperature, enables substantial energy savings to be made.

Table III provides an idea of the effects of three types of interesterification on stearyl 1, linoleyl 2 and oleyl 3 glycerol: random, directed and 1-3 regioselective.

In his recent work on tropical vegetable oils, Muderhwa [11] studied 1-3 regioselective interesterification between oils, using palm oil or its fractions as the base oil and the following oils as counter-oils: palm kernel, coconut, soybean, rapeseed and rice bran.

He noticed that the use of a lipase in free or fixed form, either in its original state or modified, requires a reliable procedure for determining interesterification ability, which, *a priori*, could have been determined by measuring hydrolytic activity employing one of the numerous methods described in the literature.

First of all, he used the Fuji Oil method [12], then the Novo method described by Hensen and Eigtved [13].

Fuji Oil uses 10 g of coconut oil and 10 g of methyl stearate, i.e. roughly a molar ratio of 1 to 2.3, and 1 g of biocatalyst. The reaction takes place at 40 °C for 24 hours.

Novo uses 12 ml of an equimolar solution (56 mM) of triolein and palmitic acid in petroleum ether, along with 275 mg of lipolytic enzyme. The reaction takes place at 40 °C for 15 to 30 minutes.

In both cases, the triglycerides are separated from the methyl esters (Fuji Oil) or from the free fatty acids (Novo) by thin layer or column chromatography.

Fuji analyzes the incorporation of lauric acid in the methyl stearate and Novo the incorporation of palmitic acid in the triolein.

Measurements are made by GC or HPLC. In both cases, the authors consider the reaction to be a first order reaction.

If « a » is the C 12 concentration in outer position and « b » the C 12 concentration in the methyl stearate, the conversion rate is $x = b/a$; the rate constant is expressed by

$$k = 1/t \ln 1/(1-x), \text{ where } t = 1 \text{ day.}$$

A specific transesterification activity (STA) is deduced:

$$K_a = k \frac{\text{Quantity of substrate used} = 20 \text{ g}}{\text{Quantity of biocatalyst used} = 1 \text{ g}}$$

$$\text{which gives: } K_a = 20 \ln \frac{1}{1-x}$$

Fuji then determines specific lipolytic activity, A, in micromoles of fatty acids released per minute and per gram of biocatalyst, using the Fukumoto method [14], then considers the ratio $K_r = K_a/A$ as characteristic of the biocatalyst. Initially, Muderhwa used the Fuji method, but quickly realised that K_r has no significance, whether it be practical or theoretical, since there is no relationship between the two types of reaction (interesterification and hydrolysis).

He thus observed that a catalytic preparation with high lipolytic activity may reveal low, nil or high interesterification activity indiscriminately; it is likewise for a catalytic preparation with low lipolytic activity.

Muderhwa then turned to the Novo method to determine interesterification or activity, but he kept Fuji substrates (copra oil and methyl stearate) and worked in a melted medium (without solvent).

Under these conditions, he expressed interesterification or transesterification activity in micromoles of lauric acid incorporated per minute in methyl stearate.

Although significant, the Novo test does not enable calculation of catalyst specific activity, since under the experimental conditions chosen, it turns out that specific transesterification activity increases with the quantity of biocatalyst (Table IV), which is obviously absurd, since, by definition, it has to be constant.

He then tried to find out what difference existed between the hydrolysis reaction and the transesterification reaction when determining specific activities. In the case of hydrolysis, the two substrates are ester and water and for transesterification they are methyl stearate and copra triglycerides.

For hydrolysis, the water is substantially overabundant, whereas for transesterification the quantities of triglycerides and methyl stearate are about the same; under these conditions it is wrong to take measurements considering the reaction as a first order reaction. In fact, when determining reaction order or the rate constant, conditions should be established such that only the concentration of the reagent (or product) on which the measurement is made is variable.

In order to respect this principle and ensure conditions analogous to hydrolysis, Muderhwa used a large quantity of corpa oil compared to the methyl stearate; he then obtained perfectly suitable results for the molar ratio of 20 : 1. Table V illustrates these results and shows that for the lipozyme, the STA has a mean value of $20 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Through this basic principle, it was possible to rationally, compare 3 lipases from three different micro-organisms (*Candida deformans*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei*), used in different forms : in their original state, fixed on celite, devitalized cells.

He obtained the results shown in tables VI, VII and VIII, which make it possible to draw the following conclusions :

For a given micro-organism, it is seen that lipase activity increases as follows :

Lipase < Fixed Lipase (Celite) < Cell.

Fixing the lipase on a macroporous ion exchanging resin considerably increases lipase activity. It is seen that lipozyme activity is 40 times greater than that of the free lipase. This factor would be even greater if activity had been compared to the quantity of enzyme fixed on the resin.

The use of whole cells seems to be a promising solution, in that it provides a naturally fixed lipase and cells can easily be confined, either simply in a mixture with a mineral support such as silica, or in an appropriate reticulum. From an economic point of view, a fixed bed reactor with confined cells would certainly be cheaper than a fixed bed reactor composed of a fixed lipase.

He thus estimated the cost of 1 kg of catalyst based on *Rhizopus arrhizus* cells; it is between 30 and 40 FFrs/kg, i.e. 100 times cheaper than the Novo lipozyme.

Nonetheless, it should be noted that lipozyme does in 4 hours what *Rhizopus arrhizus* does in 24 hours, but the lifetime of the catalyst also has to be taken into account.

At the present time, no industrial example has yet been published; from a laboratory point of view, the future is thought to lie in the use of cells.

3. — Esterification.

Esterification is of interest when the molecules obtained are defined and extremely pure.

For example, it is possible to prepare α -monoglycerides or 1-3 diglycerides in a biphasic medium by using a 1-3 specific lipase and glycerol in the aqueous phase and fatty acids in the organic phase [Gattefosse, 15].

If the organic phase is a chlorinated solvent (chloroform or dichloromethane), only the α -monoglycerides are synthesized. When this phase consists of hydrocarbons such as hexane, heptane, cyclohexane, etc., only the 1-3 diglycerides are obtained.

The selectivity is easily explained by the fact that the reaction takes place at the interface and the first products synthesized are the α -monoglycerides; in fact, the latter, which are readily soluble in chlorinated solvents, rapidly leave the interface, whereas in the case of hydrocarbons, in which they are virtually insoluble, they remain at the interface where they undergo acylation for a second time, leading to the 1-3 diglycerides which are then very soluble in the hydrocarbons, which then allows them to leave the interface quickly.

The esterification of mono-alcohols by fatty acids in a melted medium leads to waxes with virtually quantitative yields [Hensen and Eigtved, 13]. We shall not enlarge upon this type of reaction which is widely described in the literature.

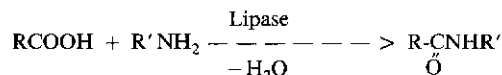
It should be noted that the thiols are easily esterified by the fatty acids and, reciprocally, the thioesters are readily hydrolysed [Gattefosse, 15; Renard *et al.*, 16].

The esterification of sugars by fatty acids catalyzed by the lipases is a subject occupying numerous research teams throughout the world. Certain laboratories have succeeded, but the yields or production costs are not satisfactory [Klibanov, 17].

4. — Substituted N amides.

In fact, lipases are acyl transferases capable of operating on heteroatoms other than oxygen.

They function with sulphur, but also with nitrogen and phosphorus, hence it is perfectly possible to prepare amides from a fatty acid and a fatty amine :



The reaction is slow, but 80 % of the yield is obtained in under 400 hours (Fig. 1). Water plays a very important role and it was seen that beyond an activity (a_w) of 0.5, the synthesis rate drops considerably [Montet *et al.*, 18] (Fig. 2). The optimal conditions are as follows : 500 mg of oleic acid, 330 mg of laurylamine (molar ratio 1 : 1; 1.775 mmole/1.775 mmole), 15 ml of hexane, 60 °C, vibro-stirred in the presence of 100 mg of Novo lipozyme.

Montet *et al.* [18] have also studied the low temperature acylation of amino-propanols (amino 1 propanol 2, amino 2 propanol 1 and amino 1 propanol 3). Hexane proved to be the best solvent leading to a higher conversion rate (85 %). In all cases, the possible products are synthesized in very different proportions, giving :

- acylated N aminopropanol,
- acylated O aminopropanol,
- diacylated O, N aminopropanol.

It is seen that an excess of fatty acids favours diacylation. For a molar ratio of 1 : 1 and when the two functions are vicinal, the enzyme always favours acylation of the amine function and from a kinetics point of view, in the case of the amino 1 propanol 3, acylation of the amine function is faster than that of the alcohol function.

In addition, when the two functions are vicinal, the amine function reacts faster in position 1 than in position 2.

It has been shown that if it is wished to obtain a pure acylated N product containing a free alcohol function, 1 mole of amino 1 propanol 2 has to be used for a mole of fatty acid.

5. — Modification of aliphatic chains.

The transformation of fatty acids by desaturation, hydrogenation, hydroxylation, oxidation, amination, etc. is still one of the bio-organicist's dreams. In fact, to date, these reactions are only possible in living systems. The few reactions reproduced *in vitro* seem difficult to transpose to a reactor due to the fact that the enzymes involved require co-factors such as NADH or NADPH which are difficult to regenerate quantitatively; nonetheless, worth mentioning is the work by Fukui and Tanaka [19] and by Van Berkel-Arts *et al.* [20]. Also worth mentioning is the work by Cardillo, Fedeli and d'Angiuro [21] concerning oxidation of linoleic acid in a continuous reactor using purified soya lipoxygenase grafted onto inert supports. The results seem to be encouraging, since this enzyme does not appear to need co-factors.

CONCLUSION

Overall, it can be seen that the activity of this multi-disciplinary field, the **Biotechnology of Fats and Oils**, is still too limited worldwide, but the important thing is that the Profession has recognized the immense potential of this science and the recent Congress in Hamburg in 1987 [22] bears witness to this fact.

From a practical point of view, it should be kept in mind that at the present time, considerable efforts need to be made in biocatalyst manufacture and stabilization and, for the time being, only those reactions providing access to high value added molecules can have an immediate future in store for them.

To conclude, it is necessary and important to note that, in order to succeed in Oils and Fats Biotechnology, the formation of a multi-disciplinary team is recommended, made up of organic chemists, biochemists, microbiologists, specialists in both chemical engineering and chemical analysis, though this is, unfortunately, rarely the case.

